

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 2 月 26 日 (26.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/017068 A1

(51) 国際特許分類⁷: G01N 33/53, 37/00, C12Q 1/68, C12N 15/09, C12M 1/00, G01N 27/30

(21) 国際出願番号: PCT/JP2002/008212

(22) 国際出願日: 2002 年 8 月 12 日 (12.08.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社日立ハイテクノロジーズ (HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION) [JP/JP]; 〒105-8717 東京都港区西新橋一丁目 2 4 番 1 4 号 Tokyo (JP).

ちなか市市毛 8 8 2 番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ設計・製造統括本部 那珂事業所内 Ibaraki (JP). 服部 久美子 (HATTORI, Kumiko) [JP/JP]; 〒312-8504 茨城県ひたちなか市市毛 8 8 2 番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ設計・製造統括本部 那珂事業所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔 (HIRAKI, Yusuke); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目 17 番 1 号 虎ノ門 5 森ビル 3 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CN, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(72) 発明者: および

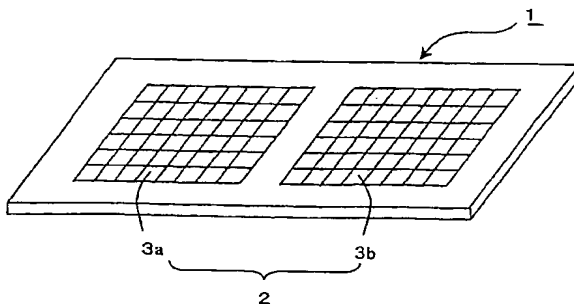
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松井 拓也 (MAT-SUI, Takuya) [JP/JP]; 〒312-8504 茨城県ひたちなか市市毛 8 8 2 番地 株式会社日立ハイテクノロジーズ設計・製造統括本部 那珂事業所内 Ibaraki (JP). 宮原 裕二 (MIYAHARA, Yuji) [JP/JP]; 〒312-8504 茨城県ひ

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF DETECTING NUCLEIC ACID BY USING DNA MICROARRAYS AND NUCLEIC ACID DETECTION APPARATUS

(54) 発明の名称: DNA マイクロアレイを用いた核酸検出方法及び核酸検出装置



(57) Abstract: A nucleic acid contained in a sample is quantified at a high accuracy. A method involving: the step of treating a nucleic acid-containing sample in DNA microarrays provided with a plural number of nucleic acid probe parts having nucleic acid probes hybridizable with a definite nucleic acid; the step of monitoring the output based on the hybridization between the nucleic acid probe and the definite nucleic acid in each of these nucleic acid probe parts so as to obtain the normal distribution of the times required for exceeding a definite output level in respective nucleic acid probe parts; and the step of quantifying the definite nucleic acid contained in the sample based on the maximum level determined by the normal distribution as described above.

[続葉有]

WO 2004/017068 A1



(57) 要約:

試料中に含まれる核酸を高精度に定量する。

所定の核酸とハイブリダイズ可能な核酸プローブを有する複数の核酸プローブ部を備えるDNAマイクロアレイに、核酸を含む試料を作用させる工程と、上記複数の核酸プローブ部それぞれについて核酸プローブと所定の核酸とのハイブリダイズに基づく出力をモニターし、上記複数の核酸プローブ部それぞれについて当該出力が所定の値を超えた時間の正規分布をとる工程と、上記工程で得られた正規分布から求められる最大値に基づいて、試料中に含まれる上記所定の核酸を定量する工程を含む。

明 細 書

DNAマイクロアレイを用いた核酸検出方法及び核酸検出装置

技術分野

本発明は、遺伝子診断、DNA配列解析、あるいは遺伝子多型解析など、バイオテクノロジーの分野、特に遺伝子検査分野に用いられるDNAマイクロアレイを用いた核酸検出方法及び核酸検出装置、並びにDNAマイクロアレイに関する。

背景技術

ヒトゲノムプロジェクトをはじめ各種生物のゲノム塩基配列解析プロジェクトが急速に進展し、膨大な塩基配列情報が蓄積されつつある。既にヒトゲノムの全塩基配列が決定されつつある。今後は生体中における遺伝子の機能を明らかにすることにより、各種疾病の診断、医薬品の開発、農作物の品種改良など広範囲な分野で遺伝子関連技術の開発が飛躍的に進むものと思われる。これらの新規分野発展の基礎となるのが、塩基配列情報に加えて遺伝子の発現及び機能情報である。遺伝子の機能及び発現解析を大規模に行い、遺伝子検査へ発展させる技術として、DNAチップあるいはDNAマイクロアレイ（以下、両者を総称してDNAマイクロアレイという）がAffymetrix社、Nanogen社などで開発されている。しかし、現状のDNAマイクロアレイの多くは蛍光検出を基本原理としているので、レーザや複雑な光学系が必要となり、システムが大型化し高価である。

また、現在開発されているDNAマイクロアレイは、試料中の遺伝子の有無を検出するものである。これに対して、試料中の遺伝子を定量できるDNAマイクロアレイは僅かである。

そこで、本発明は、上述したような実状を鑑み、試料中に含まれる核酸を高精度に定量できるDNAマイクロアレイを用いた核酸検出方法及び核酸検出装置、並びにDNAマイクロアレイを提供することを目的とする。

発明の開示

上述した目的を達成した本発明は以下を包含する。

(1) 所定の核酸とハイブリダイズ可能な核酸プローブを有する複数の核酸プローブ部を備えるDNAマイクロアレイに、核酸を含む試料を作用させる工程と、

上記複数の核酸プローブ部それぞれについて核酸プローブと所定の核酸とのハイブリダイズに基づく出力をモニターし、上記複数の核酸プローブ部それぞれについて当該出力が所定の値を超えた時間の度数分布をとる工程と、

上記工程で得られた度数分布から求められる平均値に基づいて、試料中に含まれる上記所定の核酸を定量する工程

を含むことを特徴とするDNAマイクロアレイを用いた核酸検出方法。

(2) 上記DNAマイクロアレイは、ゲート絶縁物表面に直接又は担体を介して核酸プローブを固定化してなり、上記複数の核酸プローブ部に対応した複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタを備え、当該絶縁ゲート電界効果トランジスタからの出力をモニターすることを特徴とする請求の範囲1記載のDNAマイクロアレイを用いた核酸検出方法。

(3) 上記核酸を含む試料を作用させる工程の際には、上記DNAマイクロアレイ上で当該核酸を鋳型とした核酸増幅を行うことを特徴とする請求の範囲1記載のDNAマイクロアレイを用いた核酸検出方法。

(4) 上記核酸増幅は恒温増幅法により行うことを特徴とする請求の範囲3記載のDNAマイクロアレイを用いた核酸検出方法。

(5) 所定の核酸とハイブリダイズ可能な核酸プローブを有する複数の核酸プローブ部を備えるDNAマイクロアレイを取り付ける測定部と、

上記測定部に取り付けたDNAマイクロアレイの各核酸プローブ部からの出力を検出する検出部と、

上記複数の核酸プローブ部について、上記検出部で検出した出力が所定の値を超えた時間の度数分布をとり、当該度数分布から求められる平均値に基づいて、試料中に含まれる上記所定の核酸を定量する演算部と

を備えることを特徴とする核酸検出装置。

(6) 上記DNAマイクロアレイは、ゲート絶縁物表面に直接又は担体を介して核酸プローブを固定化してなり、上記複数の核酸プローブ部に対応した複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタを備え、

上記検出部は、当該絶縁ゲート電界効果トランジスタからの出力をモニターすることを特徴とする請求の範囲5記載の核酸検出装置。

(7) 上記DNAマイクロアレイは、上記複数の核酸プローブ部を有する複数の区画を備え、上記所定の核酸と上記核酸プローブとのハイブリダイズ時間がそれぞれの区画で異なることを特徴とする特許請求の範囲5記載の核酸検出装置。

(8) 所定の核酸とハイブリダイズ可能な核酸プローブを有する複数の核酸プローブ部を備えるDNAマイクロアレイ

(9) 上記複数の核酸プローブ部に対応して配設され、所定の核酸と核酸プローブとのハイブリダイズを検出する検出部を有することを特徴とする特許請求の範囲8記載のDNAマイクロアレイ。

(10) 上記検出部は、絶縁ゲート電界効果トランジスタであることを特徴とする特許請求の範囲9記載のDNAマイクロアレイ。

(11) 上記複数の核酸プローブ部を有する複数の区画を備え、上記複数の区画では、上記所定の核酸と上記核酸プローブとのハイブリダイズ時間が異なることを特徴とする特許請求の範囲8記載のDNAマイクロアレイ。

(12) 上記複数の核酸プローブ部を有する複数の区画を備え、上記複数の区画では、上記核酸プローブ部における核酸プローブの密度が異なることを特徴とする特許請求の範囲8記載のDNAマイクロアレイ。

(13) 上記複数の核酸プローブ部を有する複数の区画を備え、上記複数の区画では、上記核酸プローブ部の面積が異なることを特徴とする特許請求の範囲8記載のDNAマイクロアレイ。

(14) 上記複数の核酸プローブ部を有する複数の区画を備え、上記複数の区画では、上記核酸プローブの長さが異なることを特徴とする特許請求の範囲8記載のDNAマイクロアレイ。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明を適用した DNA マイクロアレイを模式的に示す斜視図である。

図 2 は、DNA マイクロアレイの要部断面図である。

図 3 は、本発明を適用した核酸検出装置を模式的に示す構成図である。

図 4 は、フローセルの要部断面図である。

図 5 は、フローセルを分解して示す要部断面図である。

図 6 は、複数の核酸プローブ部からの出力を示す特性図である。

図 7 は、複数の核酸プローブ部からの出力に基づいて、信号処理回路での処理を行った結果を示す特性図である。

図 8 は、参照用電界効果トランジスタを用いて、複数の核酸プローブ部からの出力を測定する場合の回路構成図である。

図 9 は、本発明を適用した DNA マイクロアレイの他の例を模式的に示す斜視図である。

図 10 は、DNA マイクロアレイ上で行う核酸増幅の各工程を模式的に示す DNA マイクロアレイの要部断面図である。

図 11 は、核酸プローブから一重鎖核酸が伸長した状態を模式的に示す DNA マイクロアレイの要部断面図である。

図 12 は、核酸プローブから伸長した一重鎖核酸がとる高次構造を模式的に示す DNA マイクロアレイの要部断面図である。

図 13 は、2 種類のプローブを用いて DNA マイクロアレイ上で検出する際の各工程を模式的に示す DNA マイクロアレイの要部断面図である。

図 14 は、インターカレータを作用させた状態を示す DNA マイクロアレイの要部断面図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明をより詳細に説述するために、添付の図面に従ってこれを説明する。以下の図において、同じ機能部分には同じ符号を付けて説明する。

〔実施例 1〕

実施例 1 として、本発明に係る核酸検出方法を適用して、所定の遺伝子（以下、ターゲット遺伝子と称する）に含まれる一塩基多型を検出する方法を説明する。

図 1 は、本方法に用いられる DNA マイクロアレイ 1 の概略斜視図であり、図 2 は、当該 DNA マイクロアレイ 1 の要部断面図である。DNA マイクロアレイ 1 は、図 1 に示すように、マトリックス上に配された複数の核酸プローブ部 2 と、これら複数の核酸プローブ部 2 に対応して配された絶縁ゲート電界効果トランジスタ 3 とを備えている。本例の DNA マイクロアレイ 1 においては、複数の核酸プローブ部 2 が二分されており（それぞれ第 1 の領域 3 a 及び第 2 の領域 3 b とする）、第 1 の領域 3 a でターゲット遺伝子における一方の多型（以下、「第 1 の多型」という場合もある）を検出し、第 2 の領域 3 b でターゲット遺伝子における他方の多型（以下、「第 2 の多型」という場合もある）を検出する。

核酸プローブ部 2 は、絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 のゲート絶縁物 5 の表面に核酸プローブ 6 を固定化した構造である。絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 は、例えば、p 形シリコン基板 7 上に配置したキャリアの供給源となるソース 8 及びキャリアを取り出すドレイン 9 と、これら p 形シリコン基板 7、ソース 8 及びドレイン 9 上に配置したゲート絶縁物 5 とを備えている。

核酸プローブ 6 は、検出対象のターゲット遺伝子とハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチド又は c DNA 又は途中で枝分かれした DNA の断片からなる。核酸プローブ 6 は、通常 300 個以下の塩基から構成されており、適切な反応条件の下で検出対象のターゲット遺伝子とハイブリダイズでき、オリゴヌクレオチドの場合は 80 個以下の塩基長の核酸断片であることが望ましい。

本例の DNA マイクロアレイ 1 においては、第 1 の領域 3 a における核酸プローブ 6 は、第 1 の多型であるターゲット遺伝子とハイブリダイズし、第 2 の多型であるターゲット遺伝子とはハイブリダイズしないような配列を有している。一方、第 2 の領域 3 b における核酸プローブ 6 は、第 2 の多型であるターゲット遺伝子とハイブリダイズし、第 1 の多型であるターゲット遺伝子とはハイブリダイズしないような配列を有している。

ゲート絶縁物 5 は、酸化シリコン (SiO_2)、窒化シリコン (SiN)、酸化アルミニウム (Al_2O_3)、酸化タンタル (Ta_2O_5) などの材料を単独又は組み合わせて用い、通常はトランジスタ動作を良好に保つため、酸化シリコン (SiO_2) の上に窒化シリコン (SiN)、酸化アルミニウム (Al_2O_3)、酸化タンタル (Ta_2O_5) を積層する二層構造とすることが好ましい。

核酸プローブ 6 をゲート絶縁物 5 表面に固定化するためには、核酸プローブ 6 の一端をアミノ基 (NH_2 基)、チオール基 (SH 基)、ビオチンなどで化学修飾してもよい。アミノ基で化学修飾した核酸プローブ 6 を用いる場合は、ゲート絶縁物 5 の表面をアミノプロピルエトキシシラン、ポリリジンなどで化学修飾して絶縁膜表面にアミノ基を導入し、グルタルアルデヒドやフェニレンジイソシアネート (PDC) と反応させてアミノ基で化学修飾した核酸プローブ 6 をゲート絶縁物 5 表面に固定化する。チオール基で化学修飾した核酸プローブ 6 をゲート絶縁物 5 表面に固定化する場合は、ゲート絶縁物 5 上に金薄膜を形成し、チオール基と金との親和性を利用して核酸プローブ 6 を固定化する。また、ビオチンで化学修飾した核酸プローブ 6 を固定化する場合には、ゲート絶縁物 5 表面にストレプトアビジンを導入し、ビオチンとストレプトアビジンの親和性を利用して、核酸プローブ 6 をゲート絶縁物 5 表面に固定化する。実際の固定化に際しては、核酸プローブ 6 を含む溶液を、ゲート絶縁物 5 表面における所定の領域のみに滴下又はスポットし、ゲート絶縁物 5 における所望の領域上にのみ核酸プローブ 6 を固定化する。

一方、ゲート絶縁物 5 表面に固定化担体を形成し、核酸プローブ 6 を該固定化担体の表面又は内部に間接的に固定化してもよい。固定化担体の材料としては、アガロース、ポリアクリルアミド、ポリヒドロキシエチルメタクリレート (pHEMA) などを用いることができ、固定化担体をアミノ基やストレプトアビジンなどで化学修飾し、上記したように、それぞれグルタルアルデヒドや PDC、又はアビジンとの親和性を利用して核酸プローブを固定化担体に固定化することができる。このように固定化担体を介して間接的に絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 のゲート絶縁物 5 上に核酸プローブ 6 を固定することもできる。

以上のように構成されたDNAマイクロアレイ1では、検査対象の試料を作用させることによって、当該試料中に含まれるターゲット遺伝子と核酸プローブ6とが適切な反応条件のもとでハイブリダイズする。すなわち、試料中に含まれるターゲット遺伝子の多型に応じて、第1の領域3a及び第2の領域3bのいずれか一方の核酸プローブ6とターゲット遺伝子とで複合体を形成するか、第1の領域3a及び第2の領域3bの両方において核酸プローブ6とターゲット遺伝子とで複合体を形成する。

検査対象の試料を作用させる際に用いるバッファ溶液のpHの適切な条件下では、核酸は負に帯電している。したがって、核酸プローブ6とターゲット遺伝子と複合体形成により、絶縁ゲート電界効果トランジスタ4のゲート絶縁物5近傍で電荷密度が変化し、ゲート絶縁物5の表面電位が変化する。この変化が一般的な絶縁ゲート電界効果トランジスタのゲート電圧変化と同等の作用となり、チャネルの導電率を変化させる。したがって、ソース8及びドレイン9の間を流れるドレイン電流変化として、個々の核酸プローブ部2における複合体の形成を検出することができる。

個々の核酸プローブ部2における複合体の形成を検出するには、例えば、図3に示すような検出装置10を用いることができる。検出装置10は、DNAマイクロアレイ1を載置するフローセル12と、フローセル12に各種溶液を供給するための流路13と、流路13の起端部に接続されたハイブリダイゼーション液14及び洗浄液15と、ハイブリダイゼーション液14及び洗浄液15とフローセル12との間における流路13上に配設され、流路13に供給するハイブリダイゼーション液14及び洗浄液15の切り替えを行うバルブ16と、フローセル12に対する溶液の供給を制御するポンプ17と、試料及びインターカレータ等をバルブ16を介して流路13に供給するための分注器18と、流路13の終端部に接続された廃液ボトル19と、フローセル12に載置したDNAマイクロアレイ1からの出力を処理／演算する信号処理回路20とを備えている。

フローセル12は、図4に示すように、内部流路21が形成されている筐体22と、信号線となるワイヤー24を介してDNAマイクロアレイ1と電氣的

に接続されたプリント基板 25 と、プリント基板 25 と信号処理回路 20 とを電氣的に接続するピン 26 と、内部流路 21 からワイヤー 23 を隔離する保護キャップ 27 と、内部流路 21 と流路 13 とを連結するためのボルト 28 とを備えている。なお、フローセル 12 の分解断面図を図 5 に示す。

筐体 22 における内部流路 21 は、例えば直径 1 mm の穴として筐体 22 内部に穿設されてなり、筐体 22 の略中央部において DNA マイクロアレイ 1 と接している。なお、内部流路 21 は、DNA マイクロアレイ 1 における少なくとも第 1 の領域 3a 及び第 2 の領域 3b と接している。また、内部流路 21 は、内部に流路 13 を配設したボルト 28 を筐体 22 のボルト取付部 29 に取り付けることにより流路 13 と接続されている。筐体 22 のボルト取付部 29 は、ボルト 28 を取り付けるために、ボルト 28 に応じてねじ切りが形成されている。

流路 13 における内部流路 21 と接する端面には、平坦化処理が施されている。流路 13 における内部流路 21 と接する端面が平坦化されることによって、ボルト 28 を取り付けた状態で流路 13 と内部流路 21 とを密着させることができ、液漏れを防止できる。

プリント基板 25 は、複数の核酸プローブ部 2 に対応した複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタ 3 それぞれの出力を、ワイヤー 24 を介して検出することができる。

保護キャップ 26 は、例えば、アクリル、ポリプロピレン又はポリカーボネイト等からなり、筐体 22 とプリント基板 25 との間に配設される。保護キャップ 26 は、筐体 22 とプリント基板 25 との間に配設されることによって、内部流路 21 内へのワイヤー 24 の露出を防止する。

以上のように構成された検出装置 10 においては、フローセル 12 に載置した DNA マイクロアレイを用いて、検査対象の試料中に含まれるターゲット遺伝子の多型を同定することができる。具体的には、先ず、流路 13 にハイブリダイゼーション液 14 のみを供給できるようにバルブ 16 を切り替えるとともに、ポンプ 17 を駆動する。同時に、分注器 18 によりバルブ 16 を介して流路 13 に対して試料を供給する。これにより、流路 13 及びフローセル 12 の

内部流路 2 1 に、試料を含有するハイブリダイゼーション液 1 4 を供給することができ、DNA マイクロアレイ 1 における第 1 の領域 3 a 及び第 2 の領域 3 b に対して試料を作用させることができる。

これにより、第 1 の領域 3 a 又は第 2 の領域 3 b、若しくは、第 1 の領域 3 a 及び第 2 の領域 3 b において、試料に含まれるターゲット遺伝子と相補的な塩基配列を有する核酸プローブ 6 がハイブリダイズ反応する。言い換えると、試料中に含まれるターゲット遺伝子は、第 1 の領域 3 a 及び第 2 の領域 3 b に含まれる核酸プローブ 6 のうち、相補的な塩基配列を有する核酸プローブ 6 とのみハイブリダイズする。なお、反応後、流路 1 3 及び内部流路 2 1 に供給された溶液はポンプ 1 7 により廃液ボトル 1 9 に送られる。

検出装置 1 0 では、核酸プローブ 6 とターゲット遺伝子とがハイブリダイズ（複合体形成）すると、絶縁ゲート電界効果トランジスタ 3 においてドレイン電流変化として現れる。検出装置 1 0 では、絶縁ゲート電界効果トランジスタ 3 におけるドレイン電流変化をプリント基板にて検出し、信号処理回路 2 0 に対して信号を出力することができる。特に、検出装置 1 0 では、複数の核酸プローブ部 2 を備えるため、複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタ 3 それぞれの複数の信号を信号処理回路 2 0 に対して出力する。

このとき、複数の核酸プローブ部 2 では、核酸プローブ 6 とターゲット遺伝子とのハイブリダイズに時間差が生じる。したがって、複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 からの信号出力にも時間差が生じることとなる。例えば、3 つの絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 からの信号は、図 6 に示すように、それぞれ時間差をもって出力されることとなる。

信号処理回路 2 0 では、このように時間差をもった複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 からの複数の信号について、スレッショールド値を超えた時間を測定し、時間を横軸とし、スレッショールド値を超える出力が測定された核酸プローブ部 2 の個数を縦軸として度数分布をとる。そして、信号処理回路 2 0 では、得られた度数分布における平均値を、複数の核酸プローブ部 2 における出力時間とする。

測定時間を横軸とし、スレッショールド値を超える出力が測定された核酸

プローブ部 2 の個数を縦軸として度数分布をとると、例えば、図 7 に示すように、正規分布をとることとなる。この場合、信号処理回路 20 は、度数分布の平均値（この場合は正規分布の最大値）として、 T_3 を出力時間とする。したがって、信号処理回路 20 によれば、第 1 の領域 3 a に含まれる複数の核酸プローブ部 2 から得られる出力時間と、第 2 の領域 3 b に含まれる複数の核酸プローブ部 2 から得られる出力時間とを得ることができる。

そして、検出装置 10 では、第 1 の領域 3 a 及び第 2 の領域 3 b からのそれぞれの出力時間に基づいて、ターゲット遺伝子における多型を判別することができる。すなわち、ターゲット遺伝子が第 1 の多型のみを有するホモ型である場合、第 1 の領域 3 a のみから出力時間を得ることができ、逆に、ターゲット遺伝子が第 2 の多型のみを有するホモ型である場合、第 2 の領域 3 b のみから出力時間を得ることができる。また、ターゲット遺伝子が第 1 の多型と第 2 の多型とを有するヘテロ型の場合、第 1 の領域 3 a 及び第 2 の領域 3 b 両方から出力時間を得ることができる。このように、検出装置 10 によれば、第 1 の領域 3 a 及び第 2 の領域 3 b の出力時間からターゲット遺伝子の多型を判別することができる。

検出装置 10 によれば、単一の核酸プローブ部により多型を判別する場合と比較して、測定誤差を小さくすることができ、より正確な判別を行うことができる。

ところで、検出装置 10 では、上述したように、信号処理回路 20 にて出力時間を得ることによりターゲット遺伝子の多型を判別できるだけでなく、以下のようにしてターゲット遺伝子の多型を判別してもよい。すなわち、信号処理回路 20 は、所定時間経過後において信号を出力した絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 の割合を、第 1 の領域 3 a 及び第 2 の領域 3 b についてそれぞれ算出し、比較する。その結果、第 1 の領域 3 a における割合が第 2 の領域 3 b における割合と比較して大である場合、ターゲット遺伝子は第 1 の多型のみを有するホモ型であると判別でき、逆に、第 2 の領域 3 b における割合が第 1 の領域 3 a における割合と比較して大である場合、ターゲット遺伝子は第 2 の多型のみを有するホモ型であると判別できる。また、第 1 の領域 3 a における割合

と第2の領域3bにおける割合とが同等の場合、ターゲット遺伝子は第1の多型及び第2の多型を有するヘテロ型であると判別できる。

なお、例えば、第1の多型の存在を迅速に検出したい場合には、第1の領域3aに含まれる核酸プローブ部2のうちで、少なくとも1以上の核酸プローブ部2からの出力を得た時点で検出第1の多型の存在を判定しても良い。このように判定することによって、試料中に第1の多型が含まれるか否かを迅速に判定することができる。

一方、検出装置10は、図8に示すように、参照電極30及び参照用電界効果トランジスタ31と、絶縁ゲート電界効果トランジスタ4からの出力及び参照用電界効果トランジスタ31の出力の差動をとる差動測定回路32とを備えるものであっても良い。この場合、参照用電界効果トランジスタ31のゲート絶縁物表面には、ターゲット遺伝子と相補的な塩基配列を含まない核酸33を固定化している。これにより、参照用電界効果トランジスタ31のゲート絶縁物表面に固定化された核酸は、ターゲット遺伝子とハイブリダイズしない。

参照電極30は、例えば、所定組成・濃度の内部溶液に銀／塩化銀電極又はかんこう電極を浸漬してなり、内部流路21に供給される溶液に摂食する位置に配設される。参照電極30は、例えば、フローセル21内部に配設することができる。

このように構成された検出装置10では、絶縁ゲート電界効果トランジスタ4におけるドレイン電流変化を表面電位として駆動回路34で検知し、参照用電界効果トランジスタ31におけるドレイン電流変化を表面電位として駆動回路35で検知する。差動測定回路32は、駆動回路34及び駆動回路35それぞれにおける表面電位の差動をとり、差分を絶縁ゲート電界効果トランジスタ4からの信号として信号処理回路20に出力する。

このような差動測定を行って絶縁ゲート電界効果トランジスタ4からの信号を出力することによって、各絶縁ゲート電界効果トランジスタ4の電気的特性の違いや、周囲の温度や光の変化による出力値の変化を補償することができ、また、試料中の荷電粒子がゲート絶縁物5上に非特異的に吸着することによる出力値の変化を相殺することができる。これにより、検出装置10では、ター

ゲット遺伝子と核酸プローブ 6 のハイブリダイゼーションによる出力変化のみを精度良く検出することができる。

また、参照用電界効果トランジスタ 3 1 は、絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 と同じ基板に集積することが好ましい。参照用電界効果トランジスタ 3 1 を絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 と同じ基板に集積することによって、絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 と参照用電界効果トランジスタ 3 1 とにおける電気的特性を揃えることができる。

さらに、検出装置 1 0 では、絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 と同数の参照用電界効果トランジスタ 3 1 を必要とせず、複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 からの出力を得るに際して、1 つの参照用電界効果トランジスタ 3 1 を共通に使用することができるため、少なくとも 1 以上の参照用電界効果トランジスタ 3 1 を有していればよい。

さらに、参照用電極 3 0 は、電位測定の基準として使用することによって、参照用電界効果トランジスタ 3 1 と絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 との表面電位を安定に測定することができる。

ところで、上述した検出装置 1 0 では、試料中のターゲット遺伝子を定量することもできる。試料中のターゲット遺伝子を定量する場合には、予め濃度既知のターゲット遺伝子を含む複数のサンプルを用いて同様に測定し、これら複数のサンプルについて出力時間を求めておく。そして、測定対象の試料における出力時間と、複数のサンプルについての出力時間とを比較することによって、測定対象の試料に含まれるターゲット遺伝子を定量することができる。

この場合、特に、複数の核酸プローブ部 2 を用いて出力時間を測定することから、例えば、ターゲット遺伝子の非特異的なハイブリダイズに起因するノイズ成分による定量誤差を補正することができる。したがって、測定装置 1 0 によれば、測定対象の試料中に含まれるターゲット遺伝子を高精度に定量することができる。

また、検出装置 1 0 は、図 9 に示すように、第 1 の領域 3 a 及び第 2 の領域 3 b からなる第 1 の区画と、第 3 の領域 3 c 及び第 4 の領域 3 d からなる第 2 の区画と、第 5 の領域 3 e 及び第 6 の領域 3 f からなる第 3 の区画と、第 7 の

領域 3 g 及び第 8 の領域 3 h からなる第 4 の区画とを備える DNA マイクロアレイ 1 を用いても良い。これら第 1 の領域 3 a 乃至第 8 の領域 3 h は、それぞれ複数の核酸プローブ部 2 を有している。第 1 の領域 3 a、第 3 の領域 3 c、第 5 の領域 3 e 及び第 7 の領域 3 g は、ターゲット遺伝子における第 1 の多型とハイブリダイズする核酸プローブ 6 を固定化してなる。また、第 2 の領域 3 b、第 4 の領域 3 d、第 6 の領域 3 f 及び第 8 の領域 3 h は、ターゲット遺伝子における第 2 の多型とハイブリダイズする核酸プローブ 6 を固定化してなる。

また、第 1 の区画、第 2 の区画、第 3 の区画及び第 4 の区画においては、ターゲット遺伝子を含む核酸と核酸プローブ 6 とがハイブリダイズするまでの時間が、互いに異なるよう調節されている。具体的には、第 1 の区画における核酸プローブ 6 の固定化密度、第 2 の区画における核酸プローブ 6 の固定化密度、第 3 の区画における核酸プローブ 6 の固定化密度を及び第 4 の区画における核酸プローブ 6 の固定化密度をそれぞれ異なる密度とすることによって、各区画でハイブリダイズする時間が異なることとなる。また、第 1 の区画における核酸プローブ部 2 の面積、第 2 の区画における核酸プローブ部 2 の面積、第 3 の区画における核酸プローブ部 2 の面積及び第 4 の区画における核酸プローブ部 2 の面積を異なる面積とすることによって、各区画でハイブリダイズする時間が異なることとなる。さらに、第 1 の区画における核酸プローブ 6 の長さ（塩基長）、第 2 の区画における核酸プローブ 6 の長さ（塩基長）、第 3 の区画における核酸プローブ 6 の長さ（塩基長）及び第 4 の区画における核酸プローブ 6 の長さ（塩基長）を異なる長さ（塩基長）とすることによって、各区画でハイブリダイズする時間が異なることとなる。

図 9 に示した DNA マイクロアレイ 1 を用いた場合、第 1 の区画乃至第 4 の区画のそれぞれについて、信号処理回路 20 から出力時間を測定する。第 1 の区画乃至第 4 の区画においてハイブリダイズする時間が異なるため、測定した出力時間として最適な区画を選択することができる。言い換えれば、ターゲット遺伝子を含む核酸と核酸プローブ 6 とのハイブリダイズまでの時間が短すぎても長すぎても、定量に際しての誤差が大きくなる。したがって、最適な区画を選択し、選択した区画に含まれる核酸プローブ部 2 からの信号を用いて出力

時間を測定することによって、高精度に定量を行うことができる。

なお、図 9 に示した DNA マイクロアレイ 1 を用いた場合でも、第 1 の多型の存在を迅速に検出したい場合には、第 1 の領域 3 a、第 3 の領域 3 c、第 5 の領域 3 e 及び第 7 の領域 3 g のいずれかの領域に含まれる核酸プローブ部 2 のうちで、少なくとも 1 以上の核酸プローブ部 2 からの出力を得た時点で検出第 1 の多型の存在を判定しても良い。図 9 に示した DNA マイクロアレイ 1 を用いた場合には、試料中に第 1 の多型が含まれるか否かをより迅速に判定することができる。

〔実施例 2〕

実施例 2 としては、試料中にターゲット遺伝子が含まれているか否かを検出するシステムについて説明し、併せて、試料中にターゲット遺伝子が含まれている場合にターゲット遺伝子を定量するシステムについて説明する。

実施例 2 では、DNA マイクロアレイ 1 として、検出対象のターゲット遺伝子と相補的な塩基配列を少なくとも 3' 末端に有する核酸プローブ 6 の 5' 末端をゲート絶縁物 2 表面に固定化したものを使用する。

本例では、試料として組織断片や白血球から抽出したヒト染色体を含む溶液を使用することができる。特に、本例においては、固定化された核酸プローブ 6 をプライマーとし当該試料に含まれるヒト染色体を鋳型として、複数の核酸プローブ部 2 上で核酸増幅をそれぞれ行い、対応する複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 によって当該核酸増幅をモニターする。

具体的には、まず、流路 1 3 に核酸増幅に必要な試薬を供給できるようにバルブ 1 6 を切り替えるとともに、ポンプ 1 7 を駆動する。同時に、分注器 1 8 によりバルブ 1 6 を介して流路 1 3 に対してヒト染色体を含む溶液を供給する。これにより、流路 1 3 及びフローセル 1 2 の内部流路 2 1 に、ヒト染色体を含む溶液及び核酸増幅に必要な試薬を供給することができる。

次に、核酸増幅を DNA マイクロアレイ 1 上で行う。具体的に図 10 (a) ~ (d) に示すように、ヒト染色体を含む溶液に、ターゲット遺伝子を含む DNA 断片 3 8 が含まれる場合に、核酸プローブ 6 をプライマーとした核酸増幅

が行われる。すなわち、先ず図 10 (a) に示すように、ゲート絶縁物 2 を所定温度に制御することによって、核酸プローブ 6 と DNA 断片 38 におけるターゲット遺伝子の一部とがハイブリダイズ (アニーリング) する。次に、図 10 (b) に示すように、ゲート絶縁物 2 を所定温度に制御すると、核酸増幅に必要な試薬に含まれる酵素 (DNA ポリメラーゼ等) によって、DNA 断片 38 を鋳型として核酸プローブ 6 の 3' 末端から伸長反応が行われる。伸長反応の後にゲート絶縁物 2 を所定温度に制御すると熱変性して DNA 断片 38 を乖離させることができる。そして、再び、ゲート絶縁物 2 を所定温度に制御することによって、図 10 (c) に示すように、異なる核酸プローブ 6 と DNA 断片 38 におけるターゲット遺伝子の一部とがハイブリダイズ (アニーリング) する。次に、図 10 (d) に示すように、再びゲート絶縁物 2 を所定温度に制御すると、核酸増幅に必要な試薬に含まれる酵素 (DNA ポリメラーゼ等) によって、DNA 断片 38 を鋳型として核酸プローブ 6 の 3' 末端から伸長反応が行われる。

このように、ゲート絶縁物 2 の温度制御によって、DNA 断片 38 を鋳型として核酸プローブ 6 の 3' 末端からの伸長反応が順次行われる。測定対象の試料にターゲット遺伝子を含む DNA 断片 38 が含まれる場合、核酸プローブ部 2 において伸長反応が進む結果、当該核酸プローブ部 2 に対応する絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 のゲート絶縁物 5 近傍で電荷密度が変化し、ゲート絶縁物 5 の表面電位が変化する。この変化が一般的な絶縁ゲート電界効果トランジスタのゲート電圧変化と同等の作用となり、チャネルの導電率を変化させる。したがって、検査装置 10 によれば、ソース 8 及びドレイン 9 の間を流れるドレイン電流変化として、個々の核酸プローブ部 2 における伸長反応の進行を検出することができる。

本例においても、単一の核酸プローブ部によりターゲット遺伝子を検出する場合と比較して、複数の核酸プローブ部 2 を用いているために誤差を小さくすることができ、試料中のターゲット遺伝子の量が少ない場合であっても正確に検出することができる。

ところで、上述した検出装置 10 では、試料中のターゲット遺伝子を定量す

ることもできる。試料中のターゲット遺伝子を定量する場合には、予め濃度既知のターゲット遺伝子を含む複数のサンプルを用いて同様に測定し、これら複数のサンプルについて出力時間を求めておく。そして、測定対象の試料における出力時間と、複数のサンプルについての出力時間とを比較することによって、測定対象の試料に含まれるターゲット遺伝子を定量することができる。

この場合、特に、複数の核酸プローブ部2を用いて出力時間を測定することから、例えば、ターゲット遺伝子の非特異的なハイブリダイズに起因するノイズ成分による定量誤差を補正することができる。したがって、測定装置10によれば、測定対象の試料中に含まれるターゲット遺伝子を高精度に定量することができる。

具体例について以下に示す。

先ず第1の具体例としては、B型肝炎DNA (Hepatitis B Virus) の存在の有無を1種類のプローブで調べるために、5'末端をアミノ化修飾した以下の核酸プローブ6を絶縁ゲート電界効果トランジスタ4のゲート絶縁物5に固定化した。

HBVプローブ (i) : 5'-gcg gat ccg tgg agt tac tct cgt ttt tgc-3'

参照用電界効果トランジスタ31のゲート絶縁物にはHBVプローブ (i) と異なる配列を有する核酸33、例えばすべてAから構成される30塩基長の核酸33を固定化する。なお、この核酸33は、参照用電界効果トランジスタ31のゲート絶縁物に固定化せず、5'末端をアミノ基で修飾したものであってもよい。

試料は、キット (Qiagen Viral DNA Kit) を用いて、血清中からB型肝炎DNAを抽出したものを使用した。B型肝炎DNA、1×PCR Buffer (Mg²⁺plus) (TaKaRa社製)、0.4μMのdNTP、5UのTaq Polymerase (TaKaRa)を含む試料溶液100μlを分注器18よりフローセル12に導入し、以下の(1)～(3)の工程でゲート絶縁物5を加熱・冷却する。

(1) 熱変性: 94℃×3分

(2) 熱変性: 94℃×30秒、アニーリング: 55℃×30秒及び伸長反応: 72℃×30秒を1サイクルとして40サイクル

(3) 伸長反応：72℃×10分

上記(1)～(3)工程の終了後、ゲート絶縁物5の温度を上げるか、またはアルカリ性溶液を分注器18よりフローセル12に導入して二本鎖核酸を一本鎖核酸に変性させた。その後、洗浄液を分注器18よりフローセル12に導入して、基板に固定化されていない核酸、未反応の核酸及び各種成分をDNAマイクロアレイ1から除去した。次に、緩衝液を分注器18よりフローセル12に導入して、絶縁ゲート電界効果トランジスタ4の出力値を信号処理回路20により測定した。

第1の具体例では、信号処理回路20における出力値は、核酸増幅によりHBVプローブ(i)の3'末端から一重鎖核酸が伸張した結果の出力値であり、参照用電界効果トランジスタ31のゲート絶縁物に固定した核酸33と比較して塩基数が多いことにより検出が可能である。図11に、核酸プローブ6から一重鎖核酸が伸張した状態と、参照用電界効果トランジスタ31のゲート絶縁物に固定した核酸33とを模式的に示す。

第1の具体例では、B型肝炎DNAを含む試料を用いた場合、絶縁ゲート電界効果トランジスタ4と参照用電界効果トランジスタ31とにおける表面電位の差動出力は2.8mVであった。一方、B型肝炎DNAを含まない試料を用いた場合には、同様に測定した差動出力は0.4mVであった。この結果から、B型肝炎DNAを含む試料とB型肝炎DNAを含まない試料とで有意な差が得られた。

次に、第2の具体例としては、B型肝炎DNA(Hepatitis B Virus)の存在の有無を高感度に検出するため、試料中のターゲット遺伝子の存在により進行する増幅反応によって、高次構造をとるような核酸プローブ6を絶縁ゲート電界効果トランジスタ4のゲート絶縁物5に固定化した。第2の具体例で使用した核酸プローブ6は、B型肝炎DNAに相補的な塩基配列を有し、5'末端をアミノ化修飾した以下の核酸プローブ6を用いた。

HBVプローブ(ii)：5'-cat agc agc agg atg aag agg aat atg ata gga tgt gtc tgc ggc gtt t-3'

なお、本例においても、参照用電界効果トランジスタ31のゲート絶縁物にはHBVプローブ(ii)と異なる配列を有する核酸33、例えばすべてAから

構成される 30 塩基長の核酸 33 を固定化する。

第 2 の具体例においても、第 1 の具体例と同じ試薬及び反応条件で、上述した (1) ~ (3) 工程を行う。その後、同様に、基板に固定化されていない核酸、未反応の核酸及び各種成分を DNA マイクロアレイ 1 から除去するとともに信号処理回路 20 により出力値を測定した。

第 2 の具体例において、出力値は、核酸増幅により HBV プロブ (ii) の 3' 末端から一重鎖核酸が伸張するとともに高次構造を形成した結果の出力値であり、参照用電界効果トランジスタ 31 のゲート絶縁物に固定した核酸 33 と比較して塩基数が多く、かつ高次構造が異なることにより検出が可能である。図 12 に、核酸プロブ 6 から一重鎖核酸が伸長した状態と、参照用電界効果トランジスタ 31 のゲート絶縁物に固定した核酸 33 とを模式的に示す。第 2 の具体例では、図 12 に示すように、試料中に B 型肝炎 DNA が含まれる場合、伸長反応が進行する結果、核酸プロブ 6 の 3' 末端が高次構造、この場合ステム構造及びループ構造を取るようになる。このステム構造は、伸長反応によって合成された一本鎖核酸と HBV プロブ (ii) の 5' 末端から 30 塩基までとが相補的であるために形成される。また、ループ構造は、HBV プロブ (ii) の 3' 末端側から 19 塩基で形成される。

第 2 の具体例において、B 型肝炎 DNA を含む試料を用いた場合、絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 と参照用電界効果トランジスタ 31 とにおける表面電位の差動出力は 4.8 mV であった。一方、B 型肝炎 DNA を含まない試料を用いた場合には、同様に測定した差動出力は 0.5 mV であった。この結果から、B 型肝炎 DNA を含む試料と B 型肝炎 DNA を含まない試料とで有意な差が得られた。さらに、第 1 の具体例と比較して、第 2 の具体例では、核酸プロブ 6 が伸長反応の結果として高次構造と形成するため、より高感度に出力値が得られた。

次に、第 3 の具体例としては、B 型肝炎 DNA (Hepatitis B Virus) の存在の有無を 2 種類のプロブで検出するため、5' 末端をアミノ化修飾した以下の核酸プロブ 6 を絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 のゲート絶縁物 5 に固定化した。

HBV プロブ (i) : 5'-gcg gat ccg tgg agt tac tct cgt ttt tgc-3'

HBVプローブ (iii) : 5'-gca agc ttt cta aca aca gta gtt tcc gg-3'

なお、本例においても、参照用電界効果トランジスタ 31 のゲート絶縁物にはHBVプローブ (ii) と異なる配列を有する核酸 33、例えばすべてAから構成される 30 塩基長の核酸 33 を固定化する。

第3の具体例においても、第1の具体例と同じ試薬及び反応条件で、上述した(1)～(3)工程を行う。第3の具体例における核酸増幅を図13(a)～(d)に示す。なお、図13(a)～(d)では、HBVプローブ(i)を核酸プローブ6aとして表し、HBVプローブ(iii)を核酸プローブ6bとして表す。検査対象の試料にB型肝炎DNAを含む場合には、図13(a)に示すように、ゲート絶縁物2を所定温度に制御することによって、B型肝炎DNAを含むDNA断片38が核酸プローブ6aとハイブリダイズ(アニーリング)する。次に、図13(b)に示すように、ゲート絶縁物2を所定温度に制御すると、核酸増幅に必要な試薬に含まれる酵素(DNAポリメラーゼ等)によって、DNA断片38を鋳型として核酸プローブ6aの3'末端から伸長反応が行われる。次に、図13(c)に示すように、ゲート絶縁物2を所定温度に制御すると熱変性してDNA断片38を乖離させることができ、核酸プローブ6aの3'末端から伸長した領域の一部が核酸プローブ6bとハイブリダイズ(アニーリング)する。次に、図13(d)に示すように、再びゲート絶縁物2を所定温度に制御すると、核酸プローブ6aの3'末端から伸長した領域を鋳型として核酸プローブ6bの3'末端から伸長反応が進行し、最終的に核酸プローブ6aと核酸プローブ6bとの間で核酸二重鎖が形成される。

次に、分注器18によりバルブ16を介して流路13に対して緩衝液を導入し、DNAマイクロアレイ1上の未反応の試料等を除去する。その後、分注器18によりバルブ16を介して流路13に対してエチジウムブロマイドやヘキスト33258(Hoechst 33258)等のインターカレータ39を含む溶液を導入する。これにより、図14に示すように、核酸プローブ6aと核酸プローブ6bとの間で形成された核酸二重鎖に、インターカレータ39が挿入されることとなる。インターカレータ39は二本鎖の核酸とのみ反応して結合し、一本鎖の核酸には結合しない。核酸二重鎖にインターカレータ39を挿入した後、第1の具体

例と同様にして信号処理回路 20 により出力値を測定した。

その結果、B 型肝炎 DNA を含む試料を用いた場合には、差動出力は 5.6 mV であった。B 型肝炎 DNA を含まない試料を用いた場合には、差動出力は 0.4 mV であった。このように、第 3 の具体例においても、B 型肝炎 DNA を含む試料と B 型肝炎 DNA を含まない試料とで有意な差が得られた。一方、インターカレータ 39 を使用せず、図 13 (d) に示した核酸二重鎖の状態では測定した場合には、差動出力は 2.2 mV であった。この結果から、インターカレータ 39 は電荷を有しているのでインターカレータ 39 を含む溶液を作用させることにより、約 2 倍の高感度化を図ることができた。

次に、第 4 の具体例としては、B 型肝炎 DNA (Hepatitis B Virus) の存在の有無を 2 種類のプローブ及び鎖置換型の DNA 合成酵素を用いて検出するため、5' 末端をアミノ化修飾した以下の核酸プローブ 6 を絶縁ゲート電界効果トランジスタ 4 のゲート絶縁物 5 に固定化した。

HBV プローブ (ii) : 5' -cat agc agc agg atg aag agg aat atg ata gga tgt gtc tgc ggc gtt t-3'

HBV プローブ (iv) : 5' -tcc tct aat tcc agg atc aac aac aac cag agg ttt tgc atg gtc ccg ta-3'

本例では、B 型肝炎 DNA、0.1mM の dNTP、0.5mM の MgCl₂、32U の Bst Polymerase (New England Biolab 社製) を含む試料溶液 100 μl を分注器 18 よりフローセル 12 に導入し、65℃ でゲート絶縁物 5 をインキュベートすることによって恒温増幅反応を行った。なお、この恒温増幅反応は、図 10 (a) ~ (d) に示した場合と同様に進行する。また、本例においても、第 3 の具体例と同様にして核酸二重鎖にインターカレータ 39 を挿入した後に信号処理回路 20 により出力値を測定した。

その結果、B 型肝炎 DNA を含む試料を用いた場合には、差動出力は 5.8 mV であった。一方、B 型肝炎 DNA を含まない試料を用いた場合には、差動出力は 0.3 mV であった。このように、第 4 の具体例においても、B 型肝炎 DNA を含む試料と B 型肝炎 DNA を含まない試料とで有意な差が得られた。一方、インターカレータ 39 を使用しない状態で出力値を測定した場合には、差動出力は 2.4

mVの大きさであった。この結果から、インターカレータ 39 を含む溶液を作
用させることにより、約 2 倍の高感度化を図ることができた。

産業上の利用可能性

以上詳細に説明したように、本発明では、複数の核酸プローブ部からの出力
をモニターし、出力が所定の値を超えた核酸プローブ部の個数について時間毎
に分布をとることによって、目的とする核酸を検出するとともに定量すること
ができる。本発明によれば、目的とする核酸を高精度に検出できるとともに、
高精度に定量することができる。

請 求 の 範 囲

1. 所定の核酸とハイブリダイズ可能な核酸プローブを有する複数の核酸プローブ部を備えるDNAマイクロアレイに、核酸を含む試料を作用させる工程と、

上記複数の核酸プローブ部それぞれについて核酸プローブと所定の核酸とのハイブリダイズに基づく出力をモニターし、当該出力が所定の値を超えた核酸プローブ部の個数について時間毎に分布をとる工程と、

上記工程で得られた分布を正規化して求められる最大値に基づいて、試料中に含まれる上記所定の核酸を定量する工程

を含むことを特徴とするDNAマイクロアレイを用いた核酸検出方法。

2. 上記DNAマイクロアレイは、ゲート絶縁物表面に直接又は担体を介して核酸プローブを固定化してなり、上記複数の核酸プローブ部に対応した複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタを備え、当該絶縁ゲート電界効果トランジスタからの出力をモニターすることを特徴とする請求の範囲1記載のDNAマイクロアレイを用いた核酸検出方法。

3. 上記核酸を含む試料を作用させる工程の際には、上記DNAマイクロアレイ上で当該核酸を鋳型とした核酸増幅を行うことを特徴とする請求の範囲1記載のDNAマイクロアレイを用いた核酸検出方法。

4. 上記核酸増幅は恒温増幅法により行うことを特徴とする請求の範囲3記載のDNAマイクロアレイを用いた核酸検出方法。

5. 所定の核酸とハイブリダイズ可能な核酸プローブを有する複数の核酸プローブ部を備えるDNAマイクロアレイを取り付ける測定部と、

上記測定部に取り付けたDNAマイクロアレイの各核酸プローブ部からの出力を検出する検出部と、

上記複数の核酸プローブ部について、上記検出部で検出した出力が所定の値を超えた核酸プローブ部の個数について時間毎に分布をとり、正規化して求められる最大値に基づいて、試料中に含まれる上記所定の核酸を定量する演算部と

を備えることを特徴とする核酸検出装置。

6. 上記DNAマイクロアレイは、ゲート絶縁物表面に直接又は担体を介して核酸プローブを固定化してなり、上記複数の核酸プローブ部に対応した複数の絶縁ゲート電界効果トランジスタを備え、

上記検出部は、当該絶縁ゲート電界効果トランジスタからの出力をモニターすることを特徴とする請求の範囲5記載の核酸検出装置。

7. 上記DNAマイクロアレイは、上記複数の核酸プローブ部を有する複数の区画を備え、上記所定の核酸と上記核酸プローブとのハイブリダイズ時間がそれぞれの区画で異なることを特徴とする特許請求の範囲5記載の核酸検出装置。

8. 所定の核酸とハイブリダイズ可能な核酸プローブを有する複数の核酸プローブ部を備えるDNAマイクロアレイ

9. 上記複数の核酸プローブ部に対応して配設され、所定の核酸と核酸プローブとのハイブリダイズを検出する検出部を有することを特徴とする特許請求の範囲8記載のDNAマイクロアレイ。

10. 上記検出部は、絶縁ゲート電界効果トランジスタであることを特徴とする特許請求の範囲9記載のDNAマイクロアレイ。

11. 上記複数の核酸プローブ部を有する複数の区画を備え、上記複数の区画では、上記所定の核酸と上記核酸プローブとのハイブリダイズ時間が異なることを特徴とする特許請求の範囲8記載のDNAマイクロアレイ。

12. 上記複数の核酸プローブ部を有する複数の区画を備え、上記複数の区画では、上記核酸プローブ部における核酸プローブの密度が異なることを特徴とする特許請求の範囲8記載のDNAマイクロアレイ。

13. 上記複数の核酸プローブ部を有する複数の区画を備え、上記複数の区画では、上記核酸プローブ部の面積が異なることを特徴とする特許請求の範囲8記載のDNAマイクロアレイ。

14. 上記複数の核酸プローブ部を有する複数の区画を備え、上記複数の区画では、上記核酸プローブの長さが異なることを特徴とする特許請求の範囲8記載のDNAマイクロアレイ。

図1

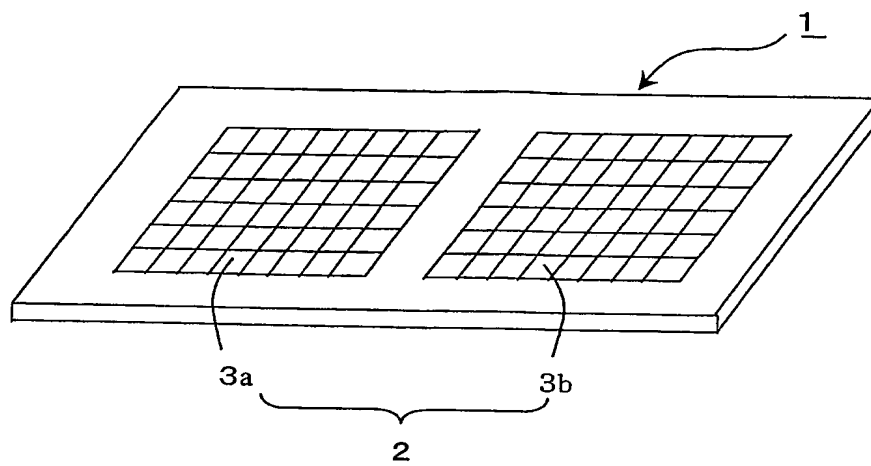


図2

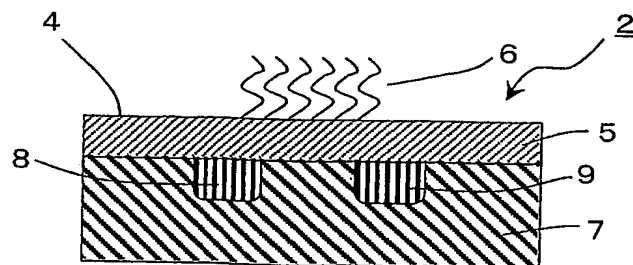


図3

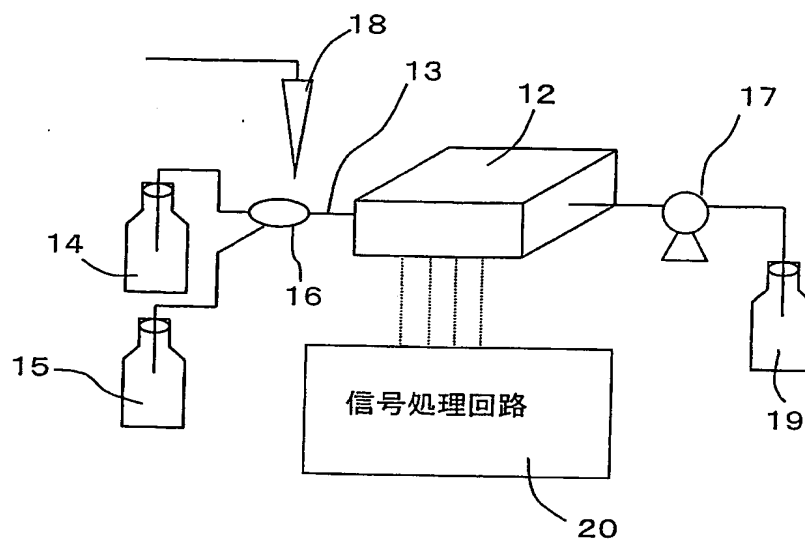


図4

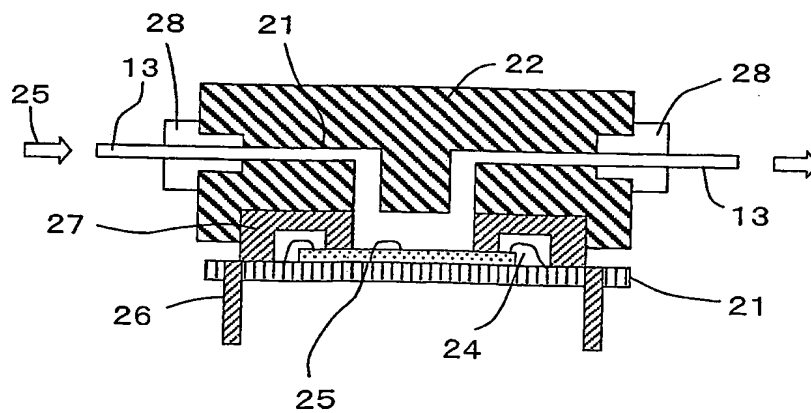


図5

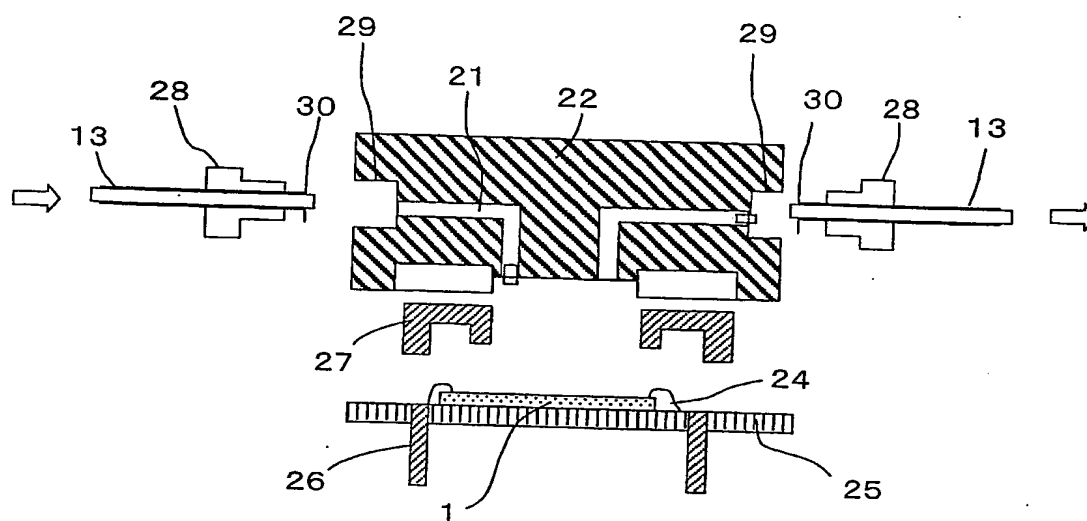


図6

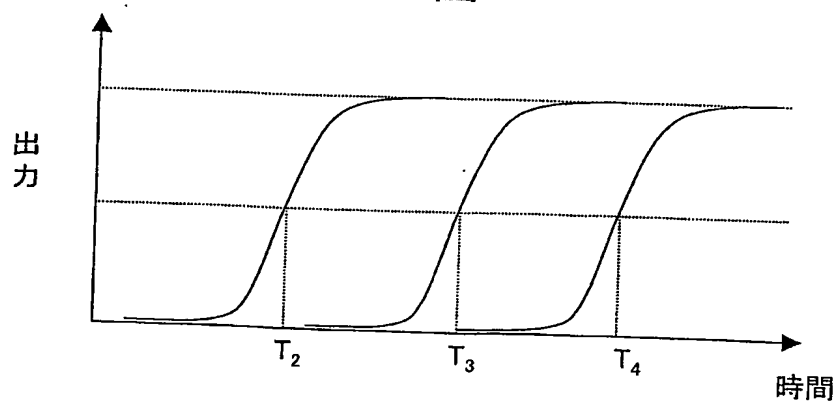


図7

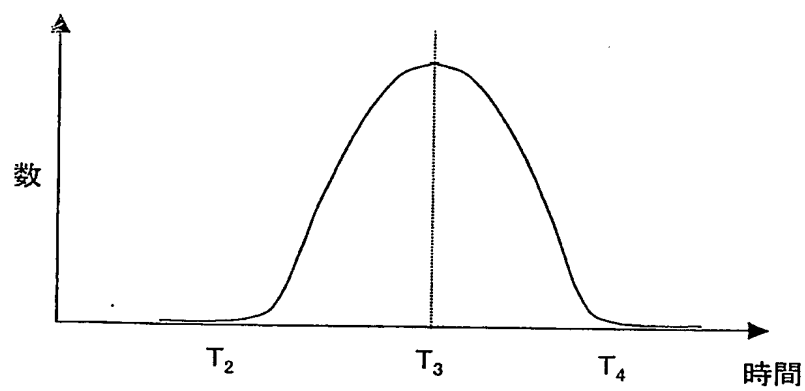


図8

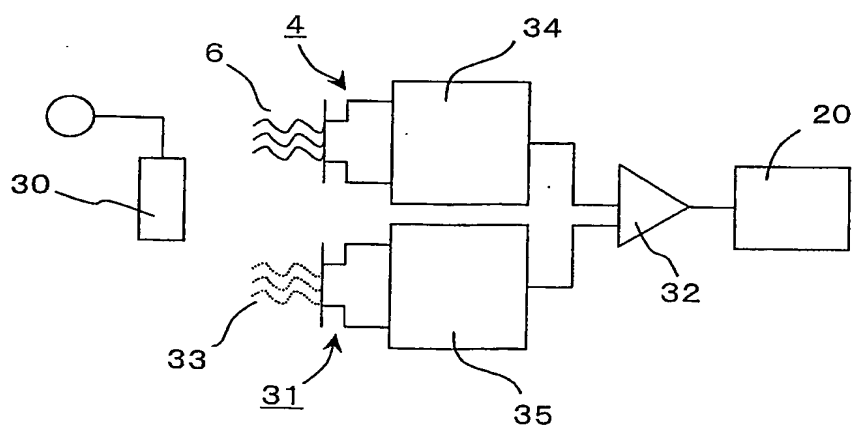


図9

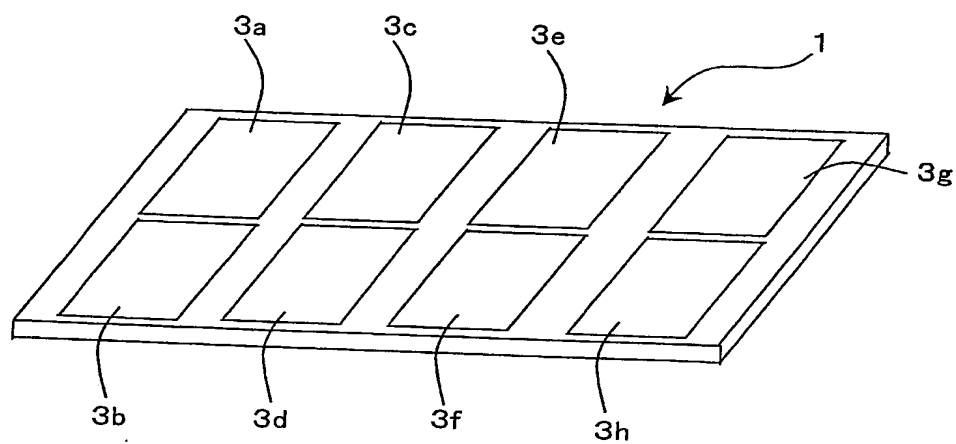


図10

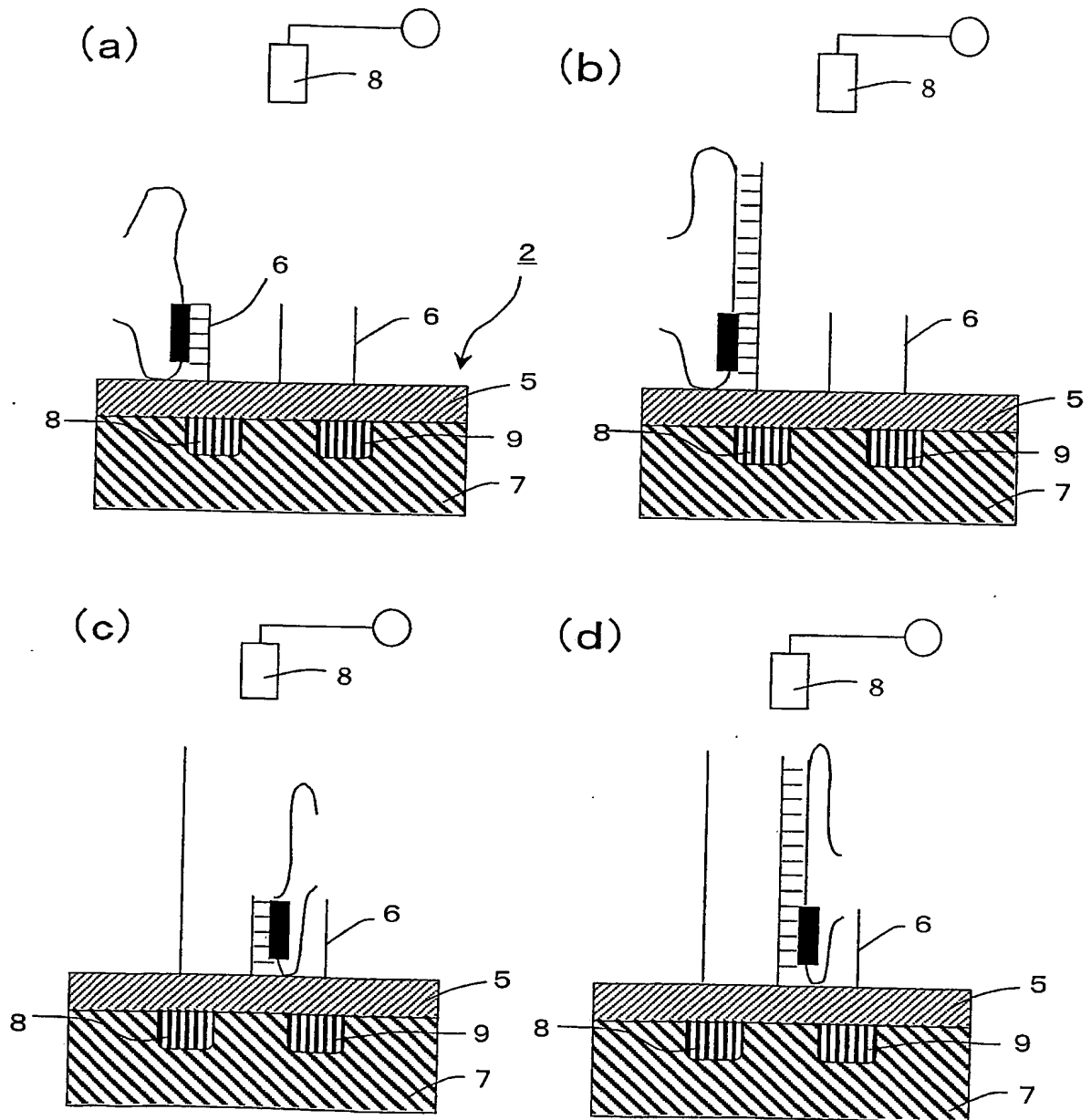


図11

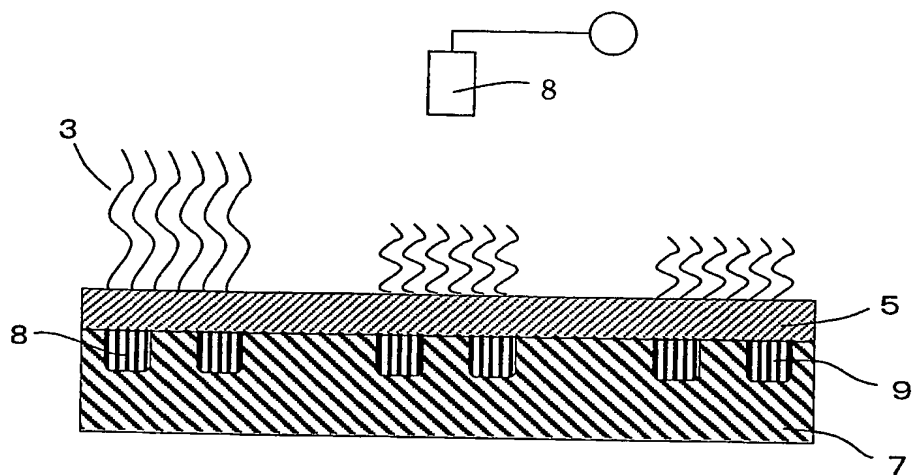


図12

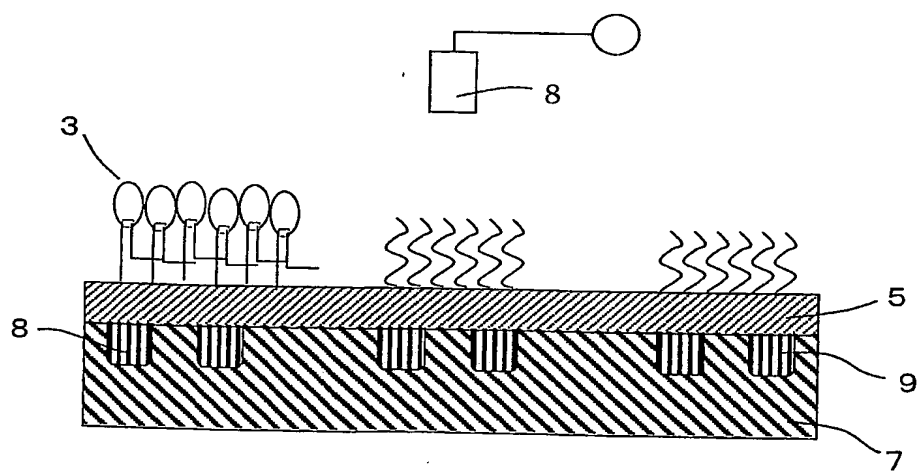


図13

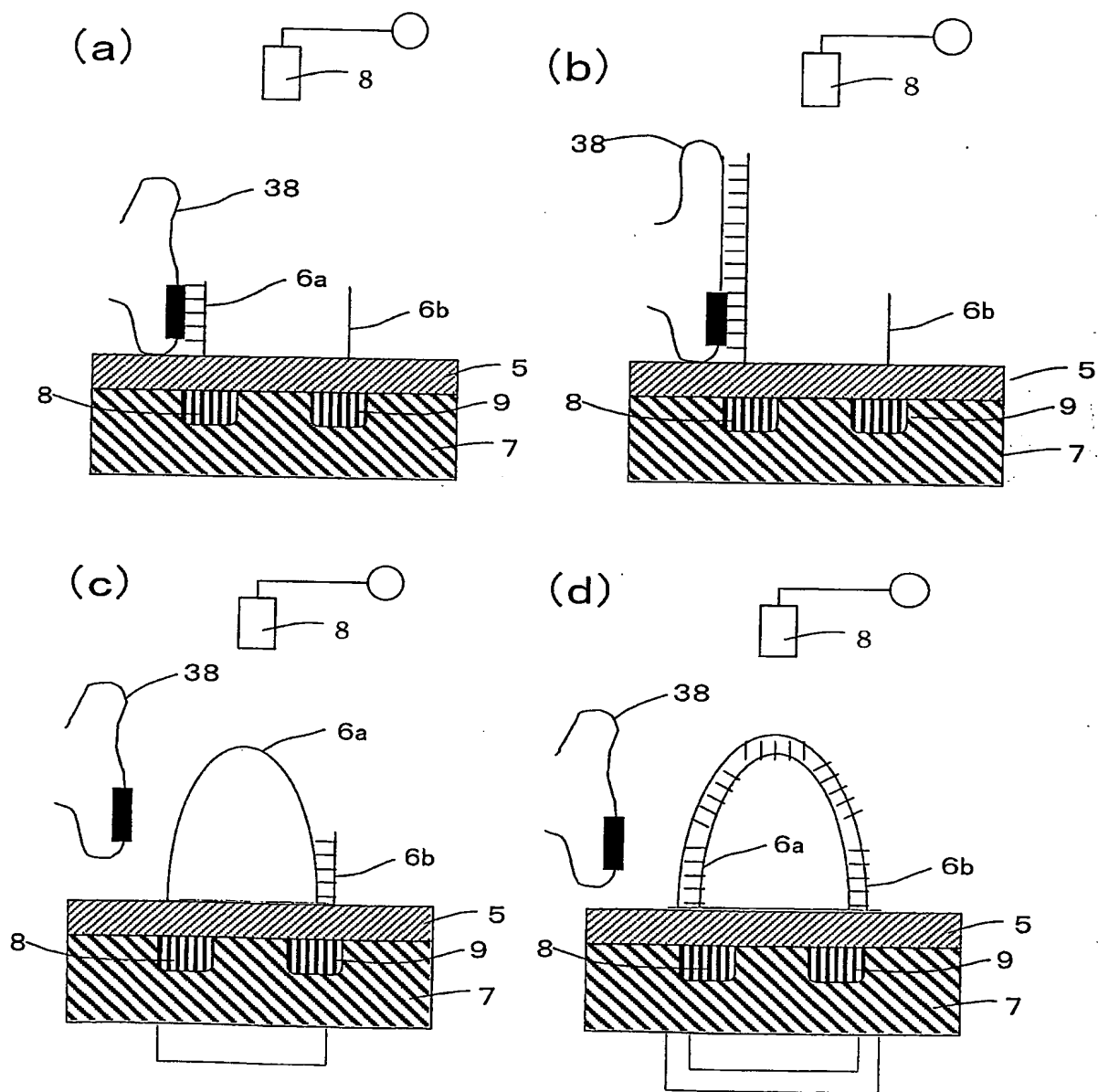
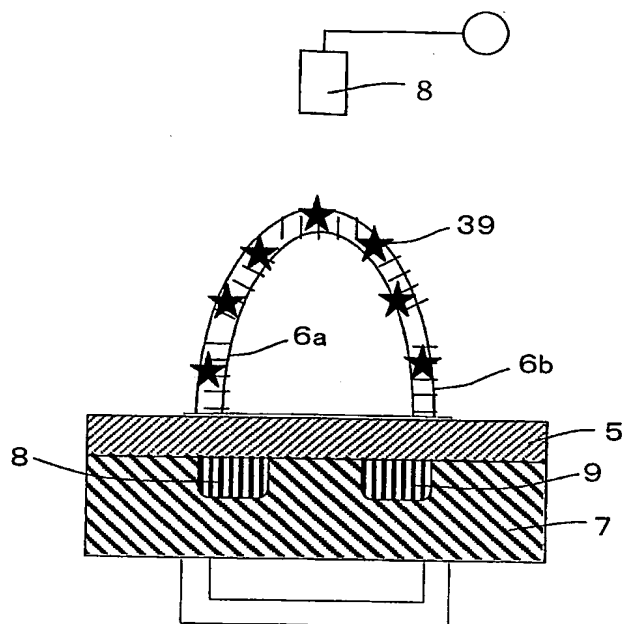


図 14



SEQUENCE LISTING

<110> Hitachi High-Technologies Corporation

<120> A method of detecting a nucleic acid using DNA
microarray and a nucleic acid detecting apparatus

<130> PH-1503-PCT

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 1

gcg gatccgt ggagttactc tcgtttttgc

30

<210> 2

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 2

catagcagca ggatgaagag gaatatgata ggatgtgtct gcggcgttt

49

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 3

gcaagctttc taacaacagt agtttccgg

29

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 4

tcctctaatt ccaggatcaa caacaaccag aggttttgca tgggtccgta

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08212

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12Q1/68, C12N15/09, C12M1/00, G01N27/30 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
|---|--|--|
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12Q1/68, C12N15/09, C12M1/00, G01N27/30 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2002 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2002 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X Y A | JP 2000-235036 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 29 August, 2000 (29.08.00), & US 2001/0018185 A | 8, 9, 12, 14 10 1-7, 11, 13 |
| X Y A | JP 2000-235035 A (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.), 29 August, 2000 (29.08.00), & EP 1010764 A | 8, 9, 12 10 1-7, 11, 13, 14 |
| A | JP 2002-31636 A (Becton Dickinson and Co.), 31 January, 2002 (31.01.02), & EP 1158449 A & CA 2348251 A | 1-7 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 17 October, 2002 (17.10.02) | | Date of mailing of the international search report 05 November, 2002 (05.11.02) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | | Authorized officer |
| Facsimile No. | | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/08212

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y A | JP 2001-321198 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 20 November, 2001 (20.11.01), & US 2001/0021504 A | 10 2, 6 |
| A | JP 2001-299346 A (Hiroyuki NANAMI), 30 October, 2001 (30.10.01), (Family: none) | 3, 4 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08212

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 7 relate to the quantification of a nucleic acid contained in a sample based on the number of nucleic acid probes showing outputs exceeding a definite level. On the other hand, the inventions as set forth in claims 8 to 14 relate merely to DNA microarrays having a plural number of probes. Such being the case, it cannot be recognized that there is a single general inventive concept between these groups of inventions.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/08212

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N 33/53 G01N 37/00 C12Q 1/68 C12N 15/09 C12M 1/00 G01N 27/30

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N 33/53 G01N 37/00 C12Q 1/68 C12N 15/09 C12M 1/00 G01N 27/30

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2002年
 日本国登録実用新案公報 1994-2002年
 日本国実用新案登録公報 1996-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|-----------------------------------|
| X Y A | JP 2000-235036 A(富士写真フイルム株式会社)2000.08.29 & US 2001/0018185 A | 8, 9, 12, 14 10 1-7, 11, 13 |
| X Y A | JP 2000-235035 A(日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社)2000.08.29 & EP 1010764 A | 8, 9, 12 10 1-7, 11, 13, 14 |
| A | JP 2002- 31636 A(ベクトン・デ・イオン・アント・カンパニー)2002.01.31 & EP 1158449 A & CA 2348251 A | 1-7 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.10.02

国際調査報告の発送日

05.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩

2J

9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y A A | JP 2001-321198 A(富士写真フイルム株式会社)2001. 11. 20 & US 2001/0021504 A JP 2001-299346 A(那波宏之)2001. 10. 30, (ファミリーなし) | 10 2, 6 3, 4 |

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-7に係る発明は、出力が所定の値を超えた核酸プローブの個数に基づいて試料中に含まれる核酸を定量するものであるのに対し、請求の範囲8-14に係る発明は、単に複数のプローブを有するDNAマイクロアレイに関する発明であるから、両者の間に単一の一般的発明概念が存在するものとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.